

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

人類卵丘顆粒細胞荷爾蒙接受器及端粒長度影響卵子成熟
及胚胎品質之機轉的研究

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 101-2314-B-040-007-

執行期間：101年08月01日至102年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：李茂盛

計畫參與人員：學士級-專任助理人員：白依萍

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102年10月31日

中文摘要： 試管嬰兒療程中許多婦女對促卵子成熟藥物的反應不良，為明瞭濾泡刺激素受體、雄性激素受體及端粒長度變化在顆粒細胞表現的機轉，我們將觀察不同年齡不孕症患者在進行常規試管嬰兒的療程中，採集卵子周圍欲丟棄的顆粒細胞分別進行體外培養，觀察顆粒細胞之相對端粒長度、濾泡刺激素受體及雄性激素受體表現與不同卵成熟度及胚胎發育至第三天不同胚胎品質之組別的差異性，此外我們亦確定卵丘細胞之主要訊息傳遞之路徑。我們共收集 25 位受試者的卵丘細胞，抽取 DNA, RNA 並進行細胞培養，以即時定量 PCR 分析受體基因表現量及相對端粒長度，並添加抑多種訊息傳遞的抑制劑，以免螢光染色觀察磷酸化蛋白的表現。我們發現濾泡刺激素受體基因在顆粒細胞的相對表現量隨著年齡的增加而表現量降低，且卵丘細胞濾泡刺激素受體表現量在發育至第三天的胚胎品質好的胚胎表現量較低，雄性激素受體則表現相反的結果。而以抑制劑 0126 及 PD98059 作用於細胞則確定 MAPK 路徑的存在。端粒相對長度與進行試管嬰兒療程之婦女年齡及胚胎品質之比較，婦女的年紀大小與端粒長度呈現有統計意義的相關，而端粒長度在在胚胎的品質良莠的評估，亦存在顯著正相關。我們可以婦女濾泡卵丘細胞相對端粒長度來推斷濾泡細胞老化以及卵子及胚胎的品質情形，這些濾泡刺激素受體及雄性激素受體表現量的差異則期望可以提供臨床治療，誘導排卵藥物及胚胎發育的方法的改善參考，以充分結合基礎研究與臨床應用，提供臨床治療的參考。

中文關鍵詞： 卵丘細胞, 端粒, 賀爾蒙接受器

英文摘要： Poor response and outcomes usually observed in IVF (in vitro fertilization) treatment cycles especially in advanced women. We developed non-invasion method to evaluate maturation of quality of embryos. The purpose of this study is to research on signal transduction pathway and telomere length in human cumulus cells affection on embryo quality. A total of 25 IVF cycles were separated two groups by different embryo quality from Aug 2012 to Jul 2013. We investigated affection of cumulus cells derived embryo quality on FSH receptor, Androgen receptor, different signal transduction pathways and telomere length. Human cumulus mass surrounding oocytes were removed soon after oocyte recovery for analysis but the oocytes retained sufficient cumulus to allow

normal fertilization. We analyzed the relative telomere length of cumulus cells by PCR methods. The signal transduction pathway was tested by addition inhibitors and analyzed by immunostain. We cultured cumulus cells and added different inhibitors to block their signal transduction pathway. The interaction of their MAPK signal or STAT3 signal transduction pathway was analyzed using immunostain. Total protein expression of Erk in cumulus cells decreased by U0126 and PD98059 inhibitor. The relative telomere length was longer in cumulus cells from good-quality embryos compared with cumulus cells from poor-quality embryos. We suggest the MAPK signal transduction pathway may affect the embryo quality. The relative telomere length in cumulus cells of oocyte collection was predictive of highly competent good-quality embryos.

英文關鍵詞： cumulus cells, telomere, hormone receptor

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

人類卵丘顆粒細胞荷爾蒙接受器及端粒長度影響卵子成熟
及胚胎品質之機轉的研究

Research on mechanism of hormone receptors and telomere
length in human cumulus cells affect on oocyte maturation and
embryo quality

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2314 - B -040 - 007 -

執行期間：101 年 8 月 1 日至 102 年 7 月 31 日

計畫主持人：李茂盛

共同主持人：

計畫參與人員：白依萍

執行單位：：中山醫學大學

中 華 民 國 102 年 10 月 31 日

目錄

中文摘要及關鍵字	III
英文摘要及關鍵字	IV
報告內容	
一、前言	1
二、目的	1
三、文獻探討	1
四、研究方法	5
五、結果與討論(含結論與建議)	8
六、計畫成果自評部份	8
七、可供推廣之研發成果資料表	9
八、參考文獻	9
九、附表及附圖	11

中文摘要及關鍵詞(keywords)。

試管嬰兒療程中許多婦女對促卵子成熟藥物的反應不良，為明瞭濾泡刺激素受體、雄性激素受體及端粒長度變化在顆粒細胞表現的機轉，我們將觀察不同年齡不孕症患者進行常規試管嬰兒的療程中，採集卵子周圍欲丟棄的顆粒細胞分別進行體外培養，觀察顆粒細胞之相對端粒長度、濾泡刺激素受體及雄性激素受體表現與不同卵成熟度及胚胎發育至第三天不同胚胎品質之組別的差異性，此外我們亦確定卵丘細胞之主要訊息傳遞之路徑。我們共收集 25 位受試者的卵丘細胞，抽取 DNA, RNA 並進行細胞培養，以即時定量 PCR 分析受體基因表現量及相對端粒長度，並添加抑多種訊息傳遞的抑制劑，以免螢光染色觀察磷酸化蛋白的表現。我們發現濾泡刺激素受體基因在顆粒細胞的相對表現量隨著年齡的增加而表現量降低，且卵丘細胞濾泡刺激素受體表現量在發育至第三天的胚胎品質好的胚胎表現量較低，雄性激素受體則表現相反的結果。而以抑制劑 0126 及 PD98059 作用於細胞則確定 MAPK 路徑的存在。端粒相對長度與進行試管嬰兒療程之婦女年齡及胚胎品質之比較，婦女的年紀大小與端粒長度呈現有統計意義的相關，而端粒長度在在胚胎的品質良莠的評估，亦存在顯著正相關。我們可以婦女濾泡卵丘細胞相對端粒長度來推斷濾泡細胞老化以及卵子及胚胎的品質情形，這些濾泡刺激素受體及雄性激素受體表現量的差異則期望可以提供臨床治療，誘導排卵藥物及胚胎發育的方法的改善參考，以充分結合基礎研究與臨床應用，提供臨床治療的參考。

關鍵詞(keywords)

顆粒細胞，端粒，激素受體

English Abstract and keywords

Poor response and outcomes usually observed in IVF (in vitro fertilization) treatment cycles especially in advanced women. We developed non-invasion method to evaluate maturation of quality of embryos. The purpose of this study is to research on signal transduction pathway and telomere length in human cumulus cells affection on embryo quality. A total of 25 IVF cycles were separated two groups by different embryo quality from Aug 2012 to Jul 2013. We investigated affection of cumulus cells derived embryo quality on FSH receptor, Androgen receptor, different signal transduction pathways and telomere length. Human cumulus mass surrounding oocytes were removed soon after oocyte recovery for analysis but the oocytes retained sufficient cumulus to allow normal fertilization. We analyzed the relative telomere length of cumulus cells by PCR methods. The signal transduction pathway was tested by addition inhibitors and analyzed by immunostain. We cultured cumulus cells and added different inhibitors to block their signal transduction pathway. The interaction of their MAPK signal or STAT3 signal transduction pathway was analyzed using immunostain. Total protein expression of Erk in cumulus cells decreased by U0126 and PD98059 inhibitor. The relative telomere length was longer in cumulus cells from good-quality embryos compared with cumulus cells from poor-quality embryos. We suggest the MAPK signal transduction pathway may affect the embryo quality. The relative telomere length in cumulus cells of oocyte collection was predictive of highly competent good-quality embryos.

Key Words: cumulus cells, telomere, hormone receptors

報告內容：

一、前言

全球許多國家均面臨少子女化、人口高齡化的影響，台灣婦女生育率亦逐年下降，在 1991-1997 年間，總生育率穩定盤旋於 1.7，然而，1998 年開始，逐年滑落下探至 2007 年的 1.1，成為超低生育率國家。民國 40 年總生育率有 7.04 人，但自 73 年起總生育率卻降至 2.1 人以下，2009 年更下降至 1 人，出生嬰兒 19 萬 1310 人，創下歷年新低(劉君雅等 2009; 陳信木等, 2010)。Leridon (2004) 的研究指出，正常的自然條件下，一名女性在 30 歲開始嘗試受孕，其在一年內懷孕成功的機率為 75%，若是在 35 歲才開始，其懷孕成功機率為 60%，到了 40 歲則只剩 44%。以現今年輕出生世代目前「晚婚遲育」甚至「少育」的現象益普遍存在著，嬰兒出生時母親年齡不斷提高，許多因素也造成「生育的老化」(aging fertility) (Sanchez-Barricarte and Fernandez-Carro, 2007)，更惶論原本就有不孕症的夫婦，因此生殖醫學的研究在現今的社會實在是相對的重要。

根據我們先前的研究，在進行人工生殖療程中，常發現高齡婦女的卵子數目和品質明顯低於年輕婦女，胚胎發育也較差。本實驗室針對在李茂盛試管嬰兒中心進行試管嬰兒療程的原發性不孕症婦女之結果進行統計分析，發現 38 歲以上與 38 歲以下的婦女之平均取卵數與懷孕率有明顯差異。受精率雖然無異，但卵的品質好壞關乎胚胎發育的潛能，與懷孕率有關，篩選最佳植入之胚胎以增加著床率並減少多胞胎率是目前生殖醫學所有臨床醫師努力的目標，如何開發出非侵入性的診斷，安全的篩選出好的胚胎標記以供臨床醫師實際治療之參考是很重要的，因此我們致力於以採卵後原本欲拋棄的顆粒細胞之基因表現的研究，進行非侵入性的卵子及胚胎品質的評估，讓不孕症的患者可以更有效率的得到健康的孩子，亦提高日益下降的生育率，改善少子化的危機。

二、研究目的

為明瞭濾泡刺激素受體、雄性激素受體及端粒長度變化在顆粒細胞表現的機轉，我們觀察不同年齡不孕症患者在進行常規試管嬰兒的療程中，採集卵子周圍欲丟棄的顆粒細胞分別進行體外培養，觀察顆粒細胞之濾泡刺激素受體及雄性激素受體訊息傳遞之主要路徑及另外亦配合端粒表現量的測定分析，分析端粒相對長度與胚胎發育的進一步相關性，但本計畫原本擬進行三年，僅獲通過一年，由於時間和經費的限制，不得不先捨棄部份構想，在有限的經費和時間內盡量完成主要研究目的。以充分結合基礎研究與臨床應用，提供臨床治療的參考。

三、文獻探討

在發育的卵泡中，顆粒細胞已知有三種功能：產生荷爾蒙(經由 cytochrome P450 aromatase 的作用產生 17 β -oestradiol ;E2)，產生生長因子 (growth factor)調

控卵細胞生長，與卵泡細胞的凋亡(apoptosis)有關。顆粒細胞所產生的生長因子，例如 transforming growth factor, activin 及 inhibin 調節腦下垂體分泌 FSH 及 LH，由 FSH 刺激顆粒細胞產生 insulin-like growth factor I, II 及 binding protein (刺激 oestradiol 及 androgen 產生), interleukin I (抑制 luteal cells 產生 progesterone)，此外還有 transferrin (其功能可能不單局限於與鐵離子結合而已，應與卵泡的發育有關)。另外顆粒細胞也能分泌 integrin 2 及 collagen type IV 之類的細胞間質，這可能與細胞間的訊息傳遞有關。而許多的動物實驗也證實產生於顆粒細胞並進而影響卵泡發育的因子尚有 Kit ligand, Leukemia inhibitory factor(LIF)。再者，來自內分泌系統、其他生殖系統之細胞或卵子本身分泌而作用於顆粒細胞而影響卵泡發育的因子則有 Basic fibroblast growth factor(bFGF), karetioncyte growth factor (KGF), Bone morphogenic protein-4 (BMP-4), Bone morphogenic protein-7 (BMP-7)。Cai 等學者於 2007 報導濾泡刺激素受體表現量與卵巢反應(ovarian response)成正相關，Feuersteiny 等人在 2007 年也提出觀察人類顆粒細胞的數個基因表現與卵子成熟有關，這些基因包括 Acute Regulatory protein(STAR), Cyclooxygenase 2 (COX2), Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 and 5 (SCD1 and SCD5), Amphiregulin (AREG)，但是無法完全對應胚胎發育的品質，McKenziem 於 2004 年提出偵測 108 個人類卵子周邊顆粒細胞的基因表現，發現 PTGS2, HAS2, GREM1 可以預測胚胎的發育情形。Hasegawa 於 2005 年提出採卵時收集的顆粒細胞中，黃體激素受體(progesterone receptor)表現量降低時，胚胎品質較好。

在發育的卵泡中，顆粒細胞已知有三種功能：產生荷爾蒙(經由 cytochrome P450 aromatase 的作用產生 17 β -oestradiol ;E2)，產生生長因子(growth factor)調控卵細胞生長，與卵泡細胞的凋亡 (apoptosis)有關。顆粒細胞所產生的生長因子，例如 transforming growth factor, activin 及 inhibin 調節腦下垂體分泌 FSH 及 LH，由濾泡刺激素刺激顆粒細胞產生 insulin-like growth factor I, II 及 binding protein (刺激 oestradiol 及 androgen 產生), interleukin I (抑制 luteal cells 產生 progesterone)，此外還有 transferrin (其功能可能不單局限於與鐵離子結合而已，應與卵泡的發育有關)。另外顆粒細胞也能分泌 integrin 2 及 collagen type IV 之類的細胞間質，這可能與細胞間的訊息傳遞有關。而許多的動物實驗也證實產生於顆粒細胞並進而影響卵泡發育的因子尚有 Kit ligand, Leukemia inhibitory factor(LIF)。再者，來自內分泌系統、其他生殖系統之細胞或卵子本身分泌而作用於顆粒細胞而影響卵泡發育的因子則有 Basic fibroblast growth factor(bFGF), karetioncyte growth factor (KGF), Bone morphogenic protein-4 (BMP-4), Bone morphogenic protein-7 (BMP-7)。Cai 等學者於 2007 報導濾泡刺激素受體表現量與卵巢反應(ovarian response)成正相關，Feuersteiny 等人在 2007 年也提出觀察人類顆粒細胞的數個基因表現與卵子成熟有關，這些基因包括 Acute Regulatory protein(STAR), Cyclooxygenase 2 (COX2), Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1

and 5 (SCD1 and SCD5), Amphiregulin (AREG), 但是無法完全對應胚胎發育的品質, McKenziem 於 2004 年提出偵測 108 個人類卵子周邊顆粒細胞的基因表現, 發現 PTGS2, HAS2, GREM1 可以預測胚胎的發育情形。我們的研究亦發現顆粒細胞中的 CKB (creatin kinase, brain) 與 PRDX2 (Peroxiredoxins 2) 可能在不同年齡婦女表現不同而影響卵子發育在高齡婦女的顆粒細胞中, 不管胚胎型態良好或不良等級的胚胎, CKB 及 PRDX2 的表現量均高於在年輕婦女顆粒細胞中的表現量。而這兩個基因均與能量、代謝及過氧化有關, 顯示在高齡婦女與年輕婦女顆粒細胞中的能量維持與代謝有異, 進而影響到卵子的品質。

在荷爾蒙受體的研究, Hasegawa 於 2005 年提出採卵時收集的顆粒細胞中, 黃體激素受體(progesterone receptor)表現量降低時, 胚胎品質較好。而我們先前的研究發現 Progesterone 及濾泡刺激素受體基因在顆粒細胞的相對表現量隨著年齡的增加而表現量增加, 而雄性激素受體在高齡則表現量降低, 濾泡刺激素與 progesterone 激素受體表現量對卵子成熟度影響的分析呈現負相關, 而觀察顆粒細胞激素受體與胚胎品質之相關性, 發現第三天的胚胎品質與這三種激素受體的相關性濾泡刺激素 receptor 及 LH receptor 在品質好的胚胎來源的卵子周邊的顆粒細胞呈現表現量較低的趨勢, 而顆粒細胞之 Androgen receptor 基因則在品質好的胚胎表現量較高且呈現統計上之差異, 而這些差異的機轉如何? 則需要進一步研究。

4. 濾泡刺激素訊息傳遞及其受體之表現

濾泡刺激素對卵巢的作用主要是通過與顆粒細胞表面的特異性卵泡刺激素受體結合來進行其作用, 濾泡刺激素受體是屬於 G 蛋白家族一型, 主要透過濾泡刺激素誘導 cAMP 形成經由活化蛋白激酶 A (protein kinase A) 與下游之 MAP kinase/ERK 來進行訊息傳遞, 也有報導指出其傳遞路徑亦同時啟動蛋白激酶 B (protein kinase B) 及蛋白激酶 C (protein kinase C), 這些路徑與促進濾泡的增生及程式性死亡可能都有關聯, 亦動物實驗報導 BMP2 (bone morphogenetic protein) 會透過 p-SMAD-EGF/BTC 及 pERK 來促進濾泡刺激素受體 mRNA 的表現(Haugen et al., 2010), EGF(表皮生長因子)會與表皮生長因子受體結合, 受體接合後會雙體化, 雙體化之後的表皮生長因子受體會活化彼此細胞內酪胺酸激酶區, 進一步活化下游不同的訊息傳遞路徑, 其主要的路徑有三(1)PI3K/ AKT 路徑, 此路徑使細胞不易進行細胞凋亡; (2) Ras/Raf/ MEK/ MAPK 路徑; (3) STAT 路徑表皮生長因子傳遞的路徑的訊息傳遞若失去正常調控, 會造成細胞過度生長、抑制細胞凋亡、增加血管新生、增加腫瘤的侵犯與轉移能力(Pang et al., 2007; Kang et al., 2008; Andersen et al., 2008)。而當此 EGF 被阻斷時, 此路徑亦會受到影響, 因此確認濾泡刺激素受體在不孕症患者表現的訊息傳遞路徑是否影響後續卵子成熟及胚胎品質是很重要的

5. 雄性激素及受體之表現

人類女性的雄性激素主要來自卵巢和腎上腺，雄性激素接受器帶有918個胺基酸，分子量為110 KDa的核蛋白，因屬固醇類核內接受器，故雄性激素與雄性激素受體(Androgen receptor)其之結合後，先引發雄性激素受體型成雙體結構(dimerization)，並與另一群蛋白質結合形成新的蛋白質複合物，才能形成具活性的雄性激素受器，具活性的雄性激素受器進入細胞核辨識 DNA上特定的androgen response element(ARE)序列後啟動下游的基因表現作用。人類的雄性激素受體的基因位在X染色體上q11-22位置上，共含有8個exon，其中exon上有兩處多型三聯合酸重複片段(polymorphic trinucleotide repeats),主要為CAG與GGC的重複片段，分別會轉譯成有功能的polyglutamine與polyglycin的胜肽類(Lubahn et al., 1988)，其中正常CAG重複序列次數約14~25次，CAG重複片段長度會負向影響雄性激素的轉錄功能與雄性激素蛋白質的產量，其中正常GGC重複序列次數約16-18次，GGC重複片段長度與CAG功能相同皆會負向影響雄性激素的轉錄功能與雄性激素蛋白質的產量(Dacheng et al., 2005)，此外生殖系統偵測到雄性激素受體活化後其中的絲胺酸(serine) 81, 308, 650會有磷酸化的現象(Iain et al., 2010),亦有報導指出前列腺癌細胞中的雄性激素受體會經由PI3A/Akt的路徑傳遞訊息，藉著磷酸化 Ser213/210 and Ser791/790來活化此路徑。因此透過不同卵子周邊顆粒細胞中雄性激素的基因多型性及路徑確認，因可讓我們確認顆粒細胞雄性激素受體基因表現影響卵子成熟度及胚胎品質的原因。

6. 端粒長度對生殖系統的影響

端粒為真核細胞內線性染色體末端一段特殊結構，由端粒 DNA 和端粒結合蛋白 (telomere binding protein)構成，其 DNA 為簡單的 TTAGGG 重複序列，在人類長度約 5~15kb，不具有編碼任何蛋白質功能，其功能是解決末端複製問題，以防止染色體末端融合、丟失，維持染色體穩定，並確保染色體在減數分裂中順利分離，由於 DNA 的末端複製不完全，使端粒隨每一次細胞分裂而變短，在組織培養中大多數哺乳類細胞經過一定分裂次數後停止複製，端粒被稱為細胞的 mitotic clock。端粒丟失與衰老關係的理論最早由 Olovniko 於 1973 提出，他認為當人類染色體末端的端粒 DNA 逐漸丟失時會促使細胞中止細胞週期，1990 年 Harley 等首先提出細胞衰老的端粒假說，即端粒隨著細胞的分裂增殖而逐漸縮短，當端粒短到一定程度而不足以維持其功能時則細胞不再分裂，陸續有學者証實端粒長度可以表現出細胞或組織器官的複製潛能與增殖能力，Kang 等學者提，正常人的口腔角化細胞端粒隨著年齡的增長而縮短，Yang 亦發現將不同年齡的腎上腺組織進行體外培養，發現端粒隨年齡增加而縮短，皮膚、肝臟、腎臟、骨骼肌也都呈現端粒隨年齡增加而縮短的現象。

研究發現端粒具有組織特異性，同一個體不同細胞的長度差別也很大，端粒酶的活性決定了端粒的長度，雖然在囊胚發育前的胚胎發育時期

是屬於不活化狀態，胚胎早期端粒長度仍受到細胞分裂時，染色體複製、重組等機制影響，一般體細胞時的端粒長度則受氧壓，自由基(free radicals)等的傷害而愈來愈短，當細胞內的氧濃度增加、低抗氧化劑、暴露於過氧化氫(H₂O₂)和特定致癌基因之表現皆會增加細胞內活性氧分子(reactive oxygen species; ROS)之產生，活化氧化還原途徑(redox-activated pathways)及導致DNA損傷，造成細胞衰老(Harman, 2003; Lu & Finkel, 2008)，端粒長度受損時在生殖系統通常會增加卵巢功能異常及流產或不孕等現象。

而以往我們只單純的用年齡來判定進行試管嬰兒療程婦女的劑量，通常認為越年輕的婦女卵子品質越好，而每個個體的實際年齡是否與真正生殖系統的細胞所表現的端粒長度有關？這在我們先前的研已有初步的發現：婦女的年紀大小與端粒長度呈現有統計意義的相關，本研究將進一步釐清單一卵子外之顆粒細胞相對端粒長度與卵子成熟度、受精率及胚胎品質之相關性，評估我們是否可以根據顆粒細胞老化的情形更精準的評估胚胎的品質良莠。

四、研究方法、

本計畫原本擬進行三年，但時間和經費的限制，僅通過一年的計畫及經費。不得不先捨棄部份構想，縮小研究組數，在有限的經費和時間內盡量完成主要研究目的。

先進行經與不孕症個案充分溝通取得其同意後，收集常規試管嬰兒療程且將進行第三天分裂期胚胎植入的個案，依不同年齡層分二組(小於等於29歲及大於等於40歲二個族群)以拉大年齡層的差異，收集採卵後原本欲丟棄的卵周圍顆粒細胞進行FSH receptor及Androgen receptor主要訊息傳遞路徑在顆粒細胞表現的研究在顆粒細胞培養的過程中適時添加抑制劑，觀察下游蛋白質的表現，確定其訊息傳遞的路徑影響胚胎品質可能的成因。

(A). 顆粒細胞的取得與貯存

我們徵得在李茂盛試管嬰兒中心進行試管嬰兒療程之病人的同意後，分別收集年輕(30歲以下)10個個案，年齡高齡(40歲以上) 15個共二組的不孕症婦女顆粒細胞，將檢體上的紅血球用RBC lysis buffer去除後，分成三部分，第一部分置於冷凍小管中，凍於液氮中，直到抽取其RNA；第二部分置於冷凍小管中，凍於液氮中，直到抽取其DNA；第三部份則進行體外培養後染色測定訊息傳遞分析。

(B). 顆粒細胞的體外培養及抑制劑的添加

無菌條件下，先用磷酸鹽緩衝液(Dulbecco's phosphate buffered saline, PBS)洗滌顆粒細胞團塊2~3次，以500 rpm離心5分鐘，顆粒細胞團塊以80 IU/ml的玻尿酸酶於37°C處理約5分鐘後，再以1500離心分鐘，沉澱下的細胞

加入細胞冷凍劑(DMEM中加入10% DMSO, 20%胎牛血清)後置於冷凍小管，將細胞冷凍於-80°C隔日放入液態氮桶儲存備用，根據卵子的成熟度及胚胎培養的結果，將三個年齡層再依品質好與品質差的回溯其最初濾泡來源的冷凍顆粒細胞，重新分組解凍細胞，以添加8%胎牛血清的DMEM培養至隔天，除去未貼附的死細胞及雜質，以不含胎牛血清的DMEM培養4小時。針對FSH受體上游傳導路徑添加抑制劑 NOG(或AG147)分別添加抑制劑，另一路徑添加P098059 (或U0126)阻斷MAPK路徑。偵測磷酸化ERK及Akt的表現情形。

(C). 細胞免疫染色

首先將細胞以磷酸緩衝液洗滌三遍後將胚胎置於載玻片上，以2%的福馬林固定15分鐘，以磷酸緩衝液洗滌三遍後，接著以0.2%的Triton X-100於室溫下處理5分鐘，以磷酸緩衝液洗滌五遍，與1%雙氧水作用10分鐘，以磷酸緩衝液洗滌三遍，以含有10%胎牛血清的磷酸緩衝液於室溫下處理1小時，接著以1mg/ml的FSH抗體或雄性激素接受器抗體於4°C培養隔夜，以TBST溶液(Tris-HCl 50 mM, Tween 20 0.025%, pH 7.8)清洗，以含有10%胎牛血清的磷酸緩衝液於室溫下處理10分鐘，再以1mg/ml二級抗體(goat anti-rabbit IgG)作用1小時，以TBST溶液清洗5遍，每遍2分鐘，以Avidin- biotinylated horseradish peroxidase處理45分鐘，再以TBST溶液清洗5次，每次5分鐘，然後以DAB溶液(0.05% DBA, 3%雙氧水溶於0.05M, pH 7.4的Tris中)處理20分鐘，再以0.05M, pH 7.4的Tris緩衝液洗滌兩次，分別以70%、80%及90%的酒精處理5分鐘漸進脫水，然後以甘油處理，在顯微鏡下觀察。

(D).比較各組顆粒細胞端粒長度基因之差異

(1).萃取細胞 DNA (Extraction of cell DNA)

首先將顆粒細胞株以PBS緩衝溶液清洗二次，然後加入0.5 ml lysis buffer [20 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% SDS]，置入微量小管，離心(12000 rpm, 4°C, 10分鐘)，取上清液，加入25 µl Proteinase K (40 mg/ml)，放置水浴作用(50°C, 6h)，然後加入10 µl RNAase (10 mg/ml)水浴2小時，再加入500 µl Phenol (pH=8)/chloroform(1:1)混合均勻，離心(12000 rpm, 4°C, 20分鐘)，將水層吸到新的離心管並加入等體積的isopropanol，混合均勻後放到-20°C冰箱靜置1小時，之後離心(12000 rpm, 4°C, 40分鐘)，取沉澱物加入1 ml 75% ethanol混合完全，離心(12000 rpm, 4°C, 30分鐘)後，自然乾燥1小時，加入適量的TE buffer溶解乾燥物，測量其吸光值已得到DNA濃度。DNA濃度(µg/ml)=稀釋倍數×DNA(OD260值)×(50 µg/ml/OD260)

(2).PCR

取1 µl (0.5 µg/µl) DNA加入14.9 µl ddH₂O混合，primer為5'CCCTAA3'及5'TTAGGG3'，再加入2.5 µl dNTP (10 mM)以及2.5 µl 10× PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl和0.1% Triton X-100)，和0.1 µl Taq DNA polymerase, 及PfuDNA polymerase (Super-Therm, 5U/µl)

於溫度循環機前處理 94°C, 5 分鐘後再進入第 1 個循環處理 94°C 1 分鐘, 57°C 1 分鐘, 並於 72°C 反應 2 分鐘, 進行 30 個循環次數, 最後再處理 72°C 反應 20 分鐘, 4°C 保存。

(3). 以時定量 PCR 測定端粒長度

以電泳方法分析端粒長度比較之差異不明顯, 故改以 Cawthon 於 2002 年發表以時定量 PCR 測定端粒長度相對於 36B4 基因之方法測定端粒的長度, 測定端粒的序列組如下 GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAG GGTGAGGGTGA GGGT, TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATC CCTA, 而 36B4 基因在體內只有一套複製體(one copy)故可用於作為評估端粒重複數樣之依據其偵測序列為 TCCCTACAGCAAGTGGGA AGGTGTAATCC, CCCATTCTATC ATCAACGGGTACAA(Table 1), 每一組基因之表現量經三次重複測定。將測定之 Ct 值帶入 $2^{\Delta Ct}$ 統計。

(E). 顆粒細胞荷爾蒙受體基因表現量的測定

(1). 抽取 RNA 顆粒細胞

使用 Dynabeads mRNA purification kit, 利用帶有 oligo-dT 的磁珠, 直接從細胞中分離純化 mRNA, 先用 lysis buffer 溶解胚胎中之物質, 再加入等量的 binding buffer, 同時取混合均勻的 Dynabeads Oligo(dT), 將其加入 1.5ml 空的微量離心管中, 再將微量離心管靜置於磁座 1 分鐘, 之後吸去上清液, 加入 100ul binding buffer 清洗一次, 再以 100ul binding buffer 溶磁珠, 將先前溶於 lysis buffer 的胚胎檢體加入 Dynabeads solution 中, 在室溫下均勻混合約 3-5 分鐘, 之後將微量離心管靜置磁座 1 分鐘, 移除上清液, 加入 200ul washing buffer 清洗磁珠 2 次, 不將 mRNA 沖出, 直接以磁珠保存於 -80°C, 經過 RNA 的反轉錄合成 DNA 後以 Trizol 萃取 RNA。為了增加 RNA 的品質, 再將 RNA 的萃取液通過 bromo-3-chloropropane 使沉澱, 再以 75% ethanol (Sigma) 洗滌。純化後的 RNA(約 0.5mg)加水後保存於 -70°C。純化後的 RNA 進行反轉錄用來合成第一股互補 cDNA。

(2). RNA 的反轉錄

合成 first-strand cDNA, 加入 Total RNAs (0.5 mg) 與 CDS primer mix (1 mL; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) 混合並加入含有 AMV reverse transcriptase (18.5 units; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 的 Dig cDNA master buffer 進行反轉錄(15 uL in total volume)。First-strand cDNA 的反轉錄在 48°C 進行 50 分鐘, 最後加入 stop solution (1 mL) 結束反應。

(F). 統計方法

本研究用 SPSS 統計軟體分析, 端粒長度、基因表現量校正後, 比較胚胎發育情形、年齡等因素以 one way ANOVA 及 t-test, Mann-Whitney's U-test, 來統計期表現量是否有統計意義, 並定義 P 值, $P < 0.05$ 時具有統計之差異。

五、結果與討論 (含結論與建議)

本研究共分為二組，於每組年齡層(小於等於 29 歲及大於等於 40 歲) 收集 10 位受試者，共收集 20 位受試者的顆粒細胞檢體，這些受試者進行試管嬰兒的年齡平均資料及賀爾蒙受體基因表現量整理於附表二

FSH 激素受體(FSH receptor)則在高齡組明顯上升，且與年輕族群比較有明顯差異，推測是高齡婦女需要更多 FSH 來刺激濾泡的成熟，故以增加受體的方式來促進濾泡成熟。對卵丘細胞包覆的卵子衍生的成熟的卵子，受精卵及第三天品質良好的胚胎，FSH receptor 的量是相對低的(圖一 A)，可以證明我們的推測：當濾泡欲成熟並發育為成熟卵子及品質良好的胚胎，會以增卵丘細胞 FSH receptor 的方式來促進卵子成熟。Androgen receptor 則在高齡組表現量相對低，卵丘細胞包覆的卵子衍生的成熟的卵子，受精卵及第三天品質良好的胚胎，androgen receptor 的量是相對高的(圖一 B)，這種現象或許與 steroid hormone receptor 的性質有關。Yang 等學者曾在 2005 年發表以 FSH receptor 評估 PCOS (polycystic ovarian syndrome) 卵子的成熟度較高較比率發育為囊胚的組別其濾泡周圍的顆粒細胞，而我們觀察到的情況為年齡越輕的組別顆粒細胞 FSH receptor 表現也越少，是否也意味著年輕的卵子較年長著成熟度高，這其間是否有關聯性是值得進一步探索的問題。不過我們亦推測其可能與基因多型性有關但礙於經費及時間無法證實。如果高齡婦女的 Androgen receptor 相對低，臨床醫師應重新評估誘發高齡婦女進行試管嬰兒療程時，此二種激素劑量的調整，是否應適度的增加劑量以應映數量不足的受體對該二種激素的刺激方可得到較佳的誘發排卵的效果。

在訊息傳遞路徑的探討方面，我們嘗試加入各種抑制劑觀察濾泡的卵丘細胞的訊息傳遞路徑的表現，由於細胞數量有限，無法進行 western blotting，故以細胞免疫染色來判定，我們在所有的添加抑制劑研究中發現以 u0126 及 PD98059 添加於培養液中，不會抑制 erk 蛋白質表現，但會抑制 erk 磷酸化蛋白(圖二及圖三)，表示卵丘細胞中存在著 MAPK pathway，進行多項訊息傳遞的作用。

端粒相對長度與進行試管嬰兒療程之婦女年齡及胚胎品質之比較(表三及表四)，婦女的年紀大小與 T/S ratio 呈現有統計意義的相關，年紀越大的婦女端粒相對長度越短，表示我們可以婦女年齡來推斷濾泡細胞老化的情形，而取自同一位受試者的檢體的不同濾泡的卵丘細胞的端粒相對長度與卵子是否成熟、是否受精及發育至第三天的胚胎品質良莠有正相關(表四)。因此這部份的結果，我們可以據以做為評估胚胎卵子成熟及胚胎發育的標準。

六、計畫成果自評

本實驗已完成全計畫第一年許可的進度及第三年部份研究內容，並已達成預期目標，已完成研究內容與原計畫相符，研究成果之學術或應用價值很適合

在學術期刊發表，此結果幫助我們了解不同年齡層婦女之顆粒細胞基因的激素受體及端粒長度表現情形，並且配合第三天胚胎發育的情形，我們發現 FSH receptor 在品質不良的胚胎的來源卵子周圍的顆粒細胞表現量較高，而 progesterone receptor 則在品質較好的胚胎來源卵子周圍的顆粒細胞表現量較高，這可能影響臨床醫師進行誘導性排卵激素劑量評估的數據，並作為不孕症婦女進行試管嬰兒胚胎發育的參考，此外藉由端粒長度之測定，可以推測生殖系統年齡與婦女實際年齡，以了解老化過程中卵丘顆粒細胞基因表現的改變，發現生殖系統老化的程度與生理年齡及胚胎品質之間皆成正比。而此種資訊將有助於提供臨床醫師在不孕症治療方面的參考，提昇高齡婦女卵子的品質，以增加篩選良好胚胎的機率並提高病患之懷孕率，減少病患屢次進行不孕症治療的心理及經濟壓力，造福不孕症的患者，對國家社會的發展則可以使許多求子者一圓心願，減少因子嗣引發的家庭問題。

對於參與之工作人員，已獲得預期之訓練如下 (1). 收集及保存細胞 DNA 及 RNA 檢體，(2). RNA 之萃取及反轉錄等分子生物技術建立 (3)細胞免疫螢光染色的技術建立 (4). Real-time PCR 原理的了解與技術建立(5) 端粒長度測定之技術(6).定量結果之分析與統計方法的操練。

七、可供推廣之研發成果資料表

根據此次結論，目前積極撰寫論文中。未來臨床醫師應可根據顆粒細胞上激素之受體表現量及端粒相對長度來推估篩選胚胎之良莠以供胚胎植入之參考。

八、參考文獻

- 張明揚、李國光、蔡鴻德、曾啓瑞、楊友壁、李茂盛、宋永魁。不孕症及生殖內分泌學，p.10-13, p.22-27。2003 年二版，合記圖書出版社
- Briggs D.A., Sharp D.J., Milled. r and Gosden R.G. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-novo expression by granulosa cells. Mol.Hum. Reprod. 5: 1107-1114, 1999.
- Cai J, Lou HY, Dong MY, Lu XE, Zhu YM, Gao HJ, Huang HF. Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells. Fertil Steril 87:1350-6, 2007
- Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR Nucleic Acids Research, 30: e47 1-6, 2002.
- Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. Hum Reprod 22:3069-77, 2007

- Hasegawa J, Yanaihara A, Iwasaki S, Otsuka Y, Negishi M, Akahane T, Okai T. Reduction of progesterone receptor expression in human cumulus cells at the time of oocyte collection during IVF is associated with good embryo quality. *Hum Reprod* 20:2194-200, 2005
- Keith E. Latham, F. Dale M. Bautista, Yuji Hirao, Marilyn J. O'Brien, and John J. Eppig. Comparison of protein synthesis patterns in mouse cumulus cells and mural granulosa cells: effects of follicle-stimulation hormone and insulin in granulosa cell differentiation in vitro. *Bio. Reprod* 61, 482–492, 1999
- Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao B, Weitzen S, Agarwal S, Blasco MA. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women--toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol* 192:1256-60; discussion 60-1, 2005
- L Speroff; R. H. Glass and N. G. Kase. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, sixth edition, Lippincott Williams & Wilkins, 1999, 201-246.
- McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004;19:2869-74.
- Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol. Reprod.*;66:237-46, 2003
- Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 15:326-37, 2007
- Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 11:461-71, 2005
- Thomas FH, Armstrong DG, Telfer EE. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 3,:76, 2003.
- Yamada S., Fujiwara H., Honda T., Higuchi T., Nakayama T., Inoue T., Maeda M. and Fujii S. Human granulosa cells express integrin α_2 and collagen type IV: possible involvement of collagen type IV in granulosa cell luteinization. *Mol Hum Repro.* 5: 607-617, 1999.
- Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y and Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles *Human Reproduction* 20: 2097–2103, 2005
- Zhang H., Vollmer M., De Geyter M., Litzistorf Y., Ladewig A., Dürrenberger M., Guggenheim R., Miny P., Holzgreve W. and De Geyter C. Characterization of an immortalized human granulosa cell line. *Mol Hum Repro.* 6: 146-153, 2000

附表一

Table 1. The primer sets used in real-time quantitative PCR

Gene name	Length (bp)	Primer (5'-3')
FSH receptor	110	F: GAGATCTCTCAGAATGATGTC R: TTGATGTAGAGCAGGTTGTTG
Androgen receptor	98	F: CTTGCATGATCTTGTCAAAC R: CTCAGACAGCATTCTGG
β -Actin	Forward-1	CTGAGGCACTCTTCCAGCCTT
	Reverse-1	CACATCTGCTGGAAGGTGGAC
	Forward-2	CTGGCACCCAGCACAATG
	Reverse-2	GCCGATCCACACGGAGTACT
36B4	Forward	GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTG AGGGT
	Reverse	TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA
telomere	Forward	TCCCTACAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
	Reverse	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

附表二

Table 2. Results of relative real-time PCR from hormone receptor in cumulus cells from different age group.

Group	Patient no	Average Age	FSH receptor	Androgen receptor
≤29	10	27.1±1.9*	1.4±0.5 ^a	4.8 ±0.8 ^b
≥40	15	41.8±0.4	4.1±1.7 ^a	2.2 ±0.6 ^b

*Mean±SD

a,b: t-test, P<0.05

附表三

Table 3. Results of relative telomere length in cumulus cells from different age group

Group	Patient no	Total cumulus number No.	Average Age	T/S ratio/cumulus
≤29	10	65	27.1±1.9*	5.5±0.6 ^a
≥40	15	50	41.8±0.4	2.2 ±0.3 ^a

*Mean±SD, #Mean±SEM

T/S ratio: relative telomere to single copy gene (T/S) ratio.

a: Mann–Whitney’s U-test, P<0.05

附表四

Table 4. Results of relative telomere length (T/S ratio) in cumulus cells from different age compared from oocyte mature, fertilization or day 3 embryo development.

	oocyte		fertilization		Day 3 embryo	
	Mature	Immature	Fertilization	Un-fertilization	Good	poor
≤29	5.2 ±0.6*	2.4 ^b ±0.8	7.3 ± 0.5	3.6 ^b ±1.2	4.2 ±0.8	4.5 ±0.7
≥40	2.3 ^a ± 0.3	1.7 ^a ±0.6	2.4 ^a ±0.4 ^t	1.9 ^a ± 0.4	1.7 ^a ± 0.3	2.4 ^a ±0.5

*Mean±SD, [#]Mean±SEM

T/S ratio: relative telomere to single copy gene (T/S) ratio.

Mann–Whitney’s U-test, a: ≤29 compared with ≥40 age group in same development groups P<0.05; b: different development groups comparison in same age group.

附圖一 (Figure 1)

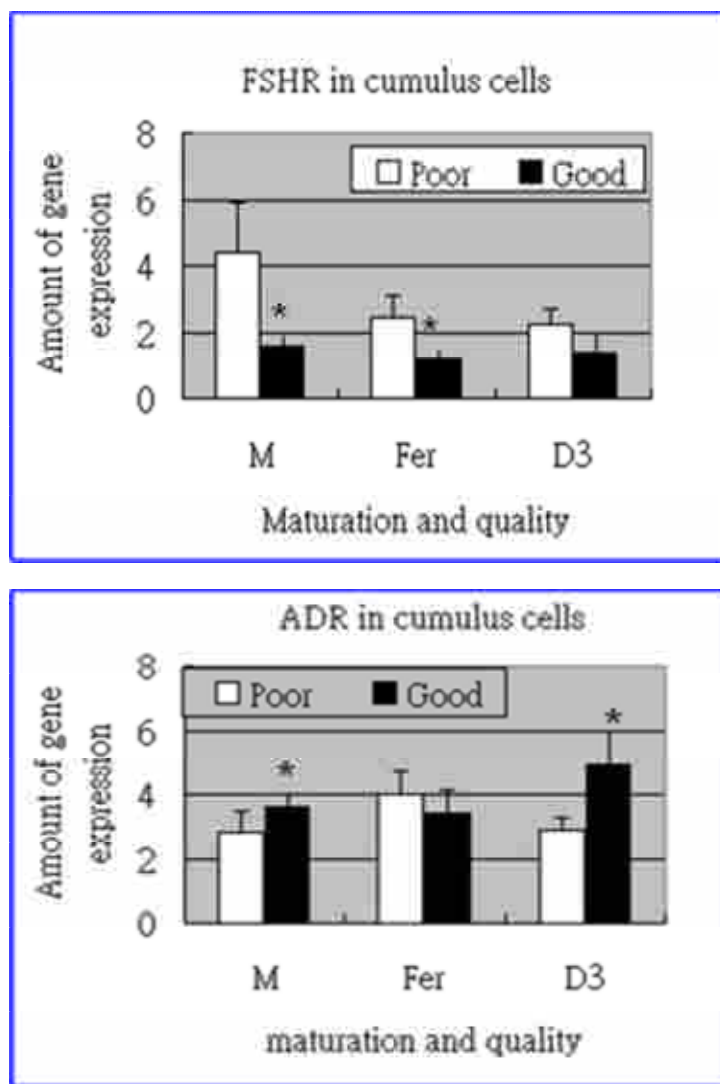


Figure 1. Relative amount of (A) FSH receptor (FSHr), (B) Androgen receptor (PRr) in cumulus cells in three different oocyte maturation (M), fertilization (Fer) and day 3 embryo quality groups (D3) . Statistics analysis by Mann–Whitney’s U-test, *mean poor v.s. good quality $P < 0.05$.

附圖二
Figure 2

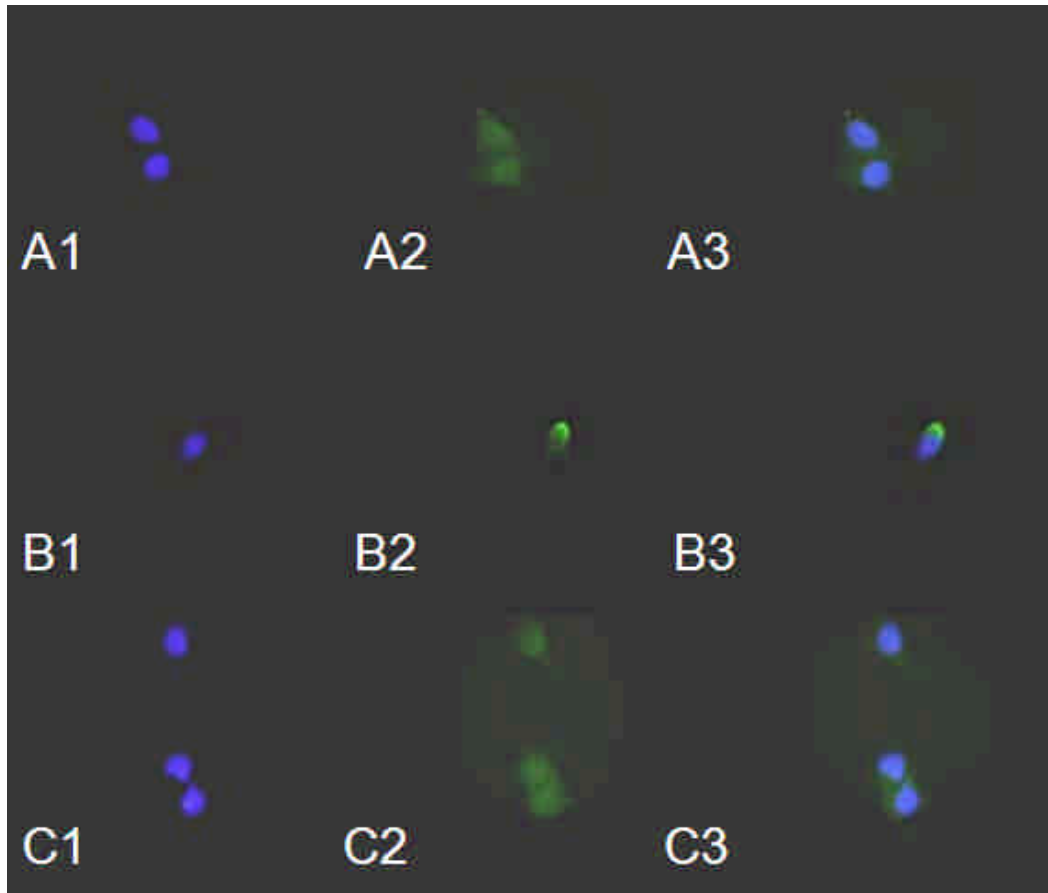


Figure 2. Erk protein expression in cumulus cells in control group (A), by PD98059 (B) and U0126 (C) inhibitor. Blue color is stained by DAPI (A1,B1,C1). Green color is stained by Erk protein (A2,B2,C2). A3, B3 and C3 are merged Erk and DAPI stain

附圖三
Figure 3

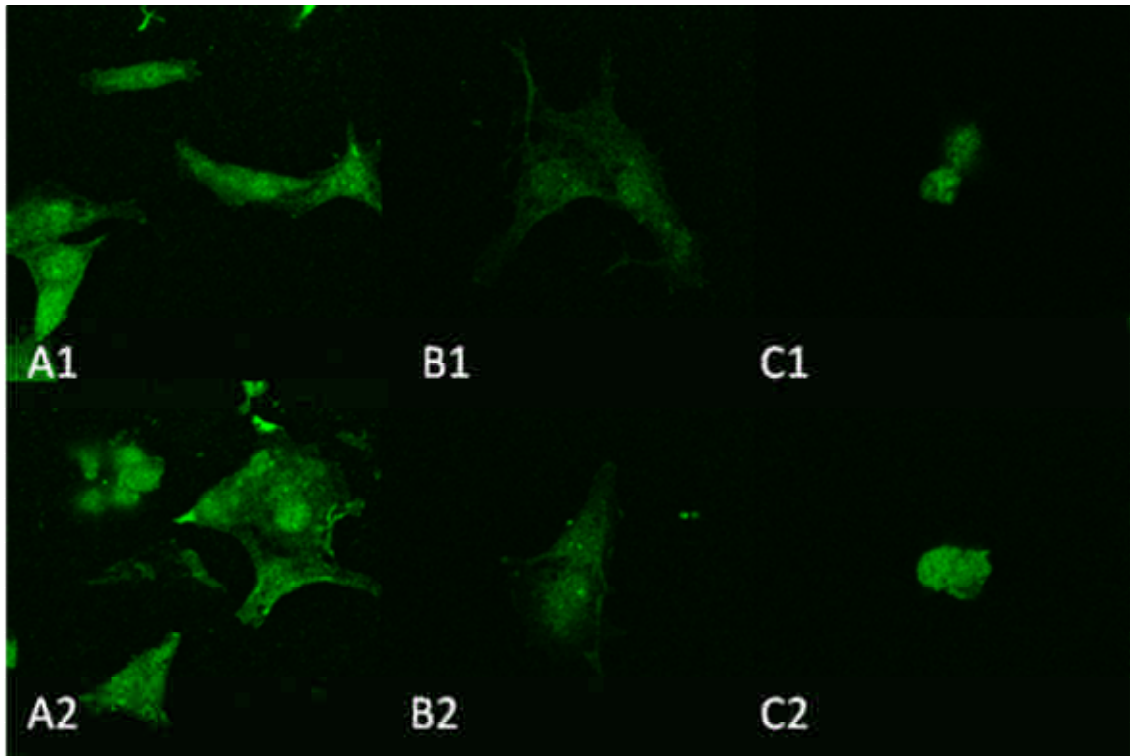


Figure 3. Erk phosphorylated protein expression in different two cumulus cells samples in A1, A2 were negative control group, B1, B2 were supplied U0126 inhibitor ; C1, C2 were supplied with PD98059 inhibitor in . Green color is stained by Erk phosphorylated protein.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/30

國科會補助計畫	計畫名稱: 人類卵丘顆粒細胞荷爾蒙接受器及端粒長度影響卵子成熟及胚胎品質之機轉的研究
	計畫主持人: 李茂盛
	計畫編號: 101-2314-B-040-007- 學門領域: 婦產科
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李茂盛		計畫編號：101-2314-B-040-007-					
計畫名稱：人類卵丘顆粒細胞荷爾蒙接受器及端粒長度影響卵子成熟及胚胎品質之機轉的研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	撰寫中
		研究報告/技術報告	1	1	100%		國科會結案報告一份
		研討會論文	1	1	100%		獲得 2013 年台灣生殖醫學會海報論文獎
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	1	1	100%		助理學習到處理卵丘細胞，Real-time PCR，免疫染色等技術的學習目標，由於三年計畫只通過一年，礙於經費不足只能擇部份研究計畫完成！
	國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇
研究報告/技術報告			0	0	100%		
研討會論文			0	0	100%		
專書			0	0	100%	章/本	
專利		申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
技術移轉		件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
參與計畫人力（外國籍）		碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		

		專任助理	0	0	100%		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)		獲得 2013 年台灣生殖醫學會海報論文獎，由於三年計畫只通過一年，礙於經費不足只能擇部份研究計畫完成！					

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

成果發表獲 2013 年台灣生殖醫學年會海報論文獎

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本計畫原申請三年，但僅通過一年，礙於經費及時間必須擇要進行研究，目前成果應可明瞭卵丘顆粒細胞荷爾蒙接受器及端粒長度是可做為老化的指標，而在學術上在試管嬰兒的療程中，顆粒細胞為採卵後無用的廢棄物，本成果可應用於臨床卵子成熟度及胚胎發育的參考，讓臨床醫師用非侵入性的科學方法，更精準進行胚胎植入的選擇，減少病患屢次進行不孕症治療的心理及經濟壓力，造福不孕症的患者，對國家社會的發展則可以使許多求子者一圓心願，減少因子嗣引發的家庭可以節省很多的健保資源。已完成研討會論文發表並獲獎，期刊論文已在撰寫中。